

# **PRODUCTION OF 4-HYDROXY-2(OR 5)-ETHYL-5(OR 2)METHYL-3(2H)-FURANONE**

Publication number: JP5176781 (A)

Publication date: 1993-07-20

Inventor(s): SASAKI MASAOKI; MATSUDO TAKANAO; NUNOMURA NOBUTAKE ;

Applicant(s): KIKKOMAN CORP +

Classification:

- international: C12P17/04; C12R1/645; C12R1/865; C12P17/02; (IPC1-7): C12P17/04

- European:

Application number: JP19910356637 19911226

Priority number(s): JP19910356637 19911226

Abstract of JP 5176781 (A)

**PURPOSE:** To provide the subject compound in high efficiency. **CONSTITUTION:** A high-protein stock like soy protein isolate or denatured defatted soybeans is digested by an enzyme such as protease, amylase or plant cell wall-digesting enzyme into a muddy form. This product is then put to solid/ liquid separation to obtain a transparent liquid, which is, in turn, put to membrane separation process like ultrafiltration, dialysis or reverse osmosis, or gel filtration to separate the substances <= 1000 in molecular weight in the liquid; a medium incorporated with the substances is inoculated with yeast to carry out culture, thus producing and accumulating the objective compound in the medium.

Data supplied from the espacenet database ---- Worldwide

特開平5-176781

(43)公開日 平成5年(1993)7月20日

(51)Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 17/04		8931-4B		
// (C 1 2 P 17/04				
C 1 2 R 1:045)				
(C 1 2 P 17/04				
C 1 2 R 1:885)				

審査請求 未請求 請求項の数1(全 6 頁)

(21)出願番号	特願平3-356837	(71)出願人	000004477 キッコーマン株式会社 千葉県野田市野田339番地
(22)出願日	平成3年(1991)12月26日	(72)発明者	佐々木 正興 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内
		(72)発明者	松戸 隆直 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内
		(72)発明者	布村 伸武 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内

(54)【発明の名称】 4-ヒドロキシ-2 (又は5) エチル-5 (又は2) メチル-3 (2H) フラノンの製造法

(57)【要約】

【目的】 4-ヒドロキシ-2 (又は5) エチル-5 (又は2) メチル-3 (2H) フラノンを効率的に製造すること。

【構成】 大豆分離蛋白質や麦性脱脂大豆などの高蛋白質含有原料を蛋白質分解酵素、澱粉質分解酵素、植物細胞壁崩壊酵素等の酵素によって泥状に分解し、次いで固液分離して澄清な液体を得、これを限外濾過膜、透析膜、逆浸透膜による膜分離法や、ゲル濾過法によって、該分解液中の分子量1000以下の物質を分離し、これを添加した培地に酵母を接種培養して、培地中に4-ヒドロキシ-2 (又は5) エチル-5 (又は2) メチル-3 (2H) フラノンを生成蓄積せしめる。

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 高蛋白質含有原料の酵素分解液を分子ふるい処理し該分解液中の分子量1000以下の物質を分離しこれを含有した培地に、酵母を接種培養して、該培地中に4-ヒドロキシ-2（又は5）エチル-5（又は2）メチル-3（2H）フランンを生成蓄積せしめることを特徴とする4-ヒドロキシ-2（又は5）エチル-5（又は2）メチル-3（2H）フランンの製造法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、風味改良剤としての利用が期待される4-ヒドロキシ-2（又は5）エチル-5（又は2）メチル-3（2H）フランン（以下、HEMFということがある）を効率的に製造する方法に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】 HEMFは先に、本発明者らが醤油成分についての研究中に醤油成分の1つとして醸造醤油より見出したもので、これを醤油、ソース、塩味津等に添加すると、味の調和が図られることなくその風味が著しく緩和された調味料が得られることから、食品の風味改良剤、特に含塩調味料の鹹味緩和剤として利用が期待されている。従来、醤油麹に約10倍量の水を加え、高温で数時間消化した後、煮沸し、濾過して得られた醤油麹消化液に醤油麹母を接種、培養して、培地中にHEMFを生成蓄積させることが知られている。

##### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、上記方法は、生成蓄積量が僅かに数ppm程度に過ぎないため工業的に有利に利用できない欠点を有する。また、HEMFは半年～1年熟成させ得られた醸造醤油中に150～400ppm存在することが知られている（昭和59年、日本農芸化学会講演要旨集、第129頁参照）が、この醤油中には確認されただけでも267の香気成分があることが知られ（日本醸造協会雑誌、第75巻、第9号、1980年、第717～728頁、「醤油の香り（2）」参照）している。従って、このように沢山の成分の中から、目的とするHEMFのみを単離精製するには、操作が繁雑となる欠点を有する。

##### 【0004】

【課題を解決するための手段】 そこで、本発明者等はこのような現状に鑑み種々検討を重ねた結果、高蛋白質含有原料の酵素分解液を分子ふるい処理し該分解液中の分子量1000以下の物質を分離しこれを添加した培地に、酵母を接種培養するときは、短期間に該培地中にHEMFを生成蓄積させることができ、これを工業的に有利に利用できることを知りこの知見に基づいて本発明を完成した。即ち、本発明は高蛋白質含有原料の酵素分解液を分子ふるい処理し該分解液中の分子量1000以下の物質を分離しこれを含有した培地に、酵母を接種、培養

して、該培地中にHEMFを生成蓄積せしめることを特徴とするHEMFの製造法である。

【0005】 以下本発明を詳細に説明する。先ず、本発明に用いられる酵母の栄養培地としては、①高蛋白質含有原料の酵素分解液を分子ふるい処理し該分解液中の分子量1000以下の物質を分離したものを適宜な水分濃度に調整したものをそのまま使用した培地、又は、②通常の酵母の培養に用いられる炭素源、窒素源、無機物その他必要とする微量の栄養素を添加含有させた合成または天然の栄養培地に、上記高蛋白質含有原料の酵素分解液を分子ふるい処理し該分解液中の分子量1000以下の物質を分離したものを添加した培地が挙げられる。

【0006】 上記合成または天然の培地における炭素源としては、例えばグルコース、フラクトース、シュクロース、マルトース、マンノース、グリセロール、澱粉、澱粉加水分解液、糖蜜、蔗糖蜜等の炭水化物、ポリアルコール、ピルビン酸、フマル酸、乳酸、酢酸等の有機酸、炭化水素、アルコール等の酵母が発酵可能な炭素源ならば何れでもよい。窒素源としては、アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の各種の無機又は有機アンモニウム塩類、尿素等の窒素含有物質、ペプトン、肉エキス、コーンスターチグリコー等の窒素性有機物質等が用いられる。

【0007】 また無機物としては、磷酸第二水素カリ等の磷酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸第一鉄等の各種金属イオンが用いられる。

【0008】 そして具体的に、合成培地としてMayer培地及び天然培地として醤油麹消化液培地等が挙げられる。

【0009】 次に本発明を実施するには、高蛋白質含有原料の酵素分解液を分子ふるい処理し該分解液中の分子量1000以下の物質を分離しこれを適宜な水分濃度に調整（濃縮、または希釈）した培地、又は上記合成または天然の栄養培地に対して、高蛋白質含有原料の酵素分解液を分子ふるい処理し該分解液中の分子量1000以下の物質を分離したものを添加した培地に、酵母を接種培養する。

【0010】 高蛋白質含有原料としては、大豆、脱脂大豆、大豆分離蛋白質、小麦グルテン、コーングルテン、油糧種子蛋白質、小麦等が挙げられる。

【0011】 次に本発明で用いられる酵素としては、蛋白質分解酵素；澱粉質分解酵素；セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ポリガラクトナーゼ等の植物細胞壁崩壊酵素；等の一種または二種以上が挙げられる。

【0012】 酵素の分解は、高蛋白質含有原料の加熱変性物に対して酵素成いは麹（米麹、醤油麹、ふすま麹）等を選和し、加水した後酵素成いは麹の作用温度範囲で浚状になるまで充分に行なう。

【0013】 この分解液を、濾布または遠心分離等によ

り固液分離し得られる該体部分をゲル濾過法、並びに膜（分子量1000以下の物質を分離し得る限外濾過膜、透析膜、逆浸透圧膜）を用いる方法等により分子ふるい処理をして、分子量1000以下の画分（物質）を集める。

【0014】本発明に於いて上記した高蛋白質含有原料の酵素分解液中の分子量1000以下の物質を用いることは極めて重要であって、分子量が1000を越える物質では、培地中にHMFを著量生成蓄積せしめることができない（後述の比較例1及びその結果を示す表1参照）。そして、高蛋白質含有原料の酵素分解液中の分子量1000以下の物質の培地への添加量は、乾物重量換算で、0.1重量%以上、特に10～60重量%が好ましい。

【0015】次に本発明に用いられる酵母としては、任意の酵母が挙げられ、具体的には醤油酵母（*Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 13356 及び *Candida etchellsii* IF0 10037、*Candida versatilis* IF0 10038）、清酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae* IF0 2106、同IF0 2164、同IF0 2342）、焼酎酵母（*Saccharomyces cerevisiae* IF0 0216）、ワイン酵母（*Saccharomyces cerevisiae* IF0 2245、同IF0 2254、シャンパン用酵母（*Saccharomyces cerevisiae* IF0 2316）、シェリー用酵母（*Saccharomyces bayanus* IF0 0262）、大酒用酵母（ウォッカ用酵母）（*Saccharomyces cerevisiae* IF0 0233）、石油酵母（*Yarrowia lipolytica* ATCC 44601）が挙げられる。

【0016】培養は、静置培養、振盪培養、通気攪拌深部培養などの条件下に行なう。培養温度は20～40℃が好適である。また培養中は培地のpHを4～7に維持することがHMFを著量生成蓄積せしめるために好ましい。培養時間は通常1～10日間で、HMFが最高に生成蓄積される時期を見計って培養を終了する。こうしてHMFが著量生成蓄積含有する培地（培養液）が得られる。

【0017】これは、そのまま風味改良剤として用いても良いが、この培地からHMFを公知の分離、採取手段、例えば有機溶媒抽出、減圧蒸留、分子蒸留、またはこれらの組合せ手段等により単離してもよい。

【0018】以下実施例を示して本発明をより具体的に説明する。

#### 【実施例1】

##### （1）酵素分解処理液の調製

蒸留水135mlに酸性プロテアーゼ「盛進製薬社製、モルシン」0.5重量%、中性プロテアーゼ「大和化成社製、サマーゼ」0.5重量%、セルラーゼ「明治製薬社製、メイセラーゼ」0.5重量%を添加溶解後、0.45μmのフィルターで濾過し、これに滅菌した大豆分離蛋白粉40gを添加溶解し、37℃、24時間保持し、酵素分解液を調製した。次いでこの分解液を

遠心分離（3,000rpm,10分）し、上澄液94mlを得た。次いでこれを分画分子量（排除限界）1000の透析チューブに入れ、容量2リットルの蒸留水に懸垂し24時間透析し、これを合計3回繰返した。この3回の透析によって、合計約6.8リットルの透析外液（透過液）と約0.2リットルの透析内液を得た。この透析外液と透析内液をそれぞれ減圧濃縮し、分画分子量1000以下の画分の濃縮液100mlと、分画分子量1000を越える画分の濃縮液100mlを得た。

##### （2）酵母の培養

上記分画分子量1000以下の画分の濃縮液をそのまま酵母接種用の培地（但し醤油酵母用の場合は食塩含量を17%に調整した）として使用し、この3mlを5ml容ネジロキャップ付きバイアルビンにとり、表1に記載の酵母をスラントから1白金耳接種し、時々攪拌しながら、30℃で1週間静置培養したところ、表1に記載の如きHMFを著量含有する培養液（実施例1）を得た。

#### 【0019】

##### 【実施例2】

##### （1）栄養培地（醤油麹消化液培地）の調製

醤油麹100gを布袋に取り、蒸留水1000mlに加えて58℃で7.5時間保持し、次に5℃で1夜袋を吊り下げ、消化液950ml（pH6.54）を得た。次にこれを2～3分濃縮後濾過して濃縮液885mlを得た。これにグルコースを5重量%となるように加えて、栄養培地とした（但し、醤油麹酵母用の場合は食塩含量を17%に調整した）。

##### （2）酵母の培養

次に、上記実施例1のHMFの製造法において得られた分画分子量1000以下の画分の濃縮液を3.7mlとり、これを更に濃縮して乾固物としたものを上記で調製した栄養培地（醤油麹消化液）2.0ml中に投入し、酵母接種用の栄養培地を調製した。次に、この調製した培地を5ml容ネジロキャップ付きバイアルビンにとり、これに、表1に記載の酵母をスラントから1白金耳接種し、時々攪拌しながら、30℃で1週間静置培養したところ、表1に記載の如き、HMFを著量含有する培養液（実施例2）を得た。

#### 【0020】

【比較例1】比較のため上記実施例2のHMFの製造法において、「透析外液（透過液）」に代えて「透析内液（分画分子量1000以上の画分）」を用いる以外は全く同様にして、HMFを製造した。その結果を表1に示す。

#### 【0021】

【比較例2】また、比較のため上記実施例2のHMFの製造法において、「透析外液（透過液）」に代えて「酵素分解処理液」をそのまま用いる以外は全く同様にして、HMFを製造した。その結果を表1に示す。

【0022】そして、上記実施例及び実験例で得られた培養液中のHEMFをガスクロマトグラフィーにて分析を行なった (Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol35 934(1991)参照)。また、上記実施例2及び比較例2の培養液をそれぞれ高速液体クロマトグフィー

(HPLC)にて分析した。その結果をそれぞれ図1及び図2に示す。

【0023】

【表1】

項目 区分	酵母の種類	培地の特徴	HEMF (ppm)	備考 (精製の難易)
実施例1	醤油酵母(注1)	透析膜透過液(注5)	52.17	容易
〃	清酒酵母(注2)	〃	67.25	〃
〃	ワイン酵母(注3)	〃	45.32	〃
実施例2	醤油酵母(注1)	同上 + 栄養培地	61.65	〃(図1参照)
〃	清酒酵母(注2)	〃	74.13	〃
〃	焼酎酵母(注4)	〃	53.87	〃
実施例3	醤油酵母(注1)	限外濾過膜(注6)	48.21	〃
比較例1	醤油酵母(注1)	透析内液(注7)	5.25	—
比較例2	醤油酵母(注1)	酵素分解液そのもの	70.56	困難(図2参照)

注1: *Zygosaccharomyces roxii* ATCC 13356

注2: *Saccharomyces cerevisiae* IF0 2342

注3: *Saccharomyces cerevisiae* IF0 2245

注4: *Saccharomyces cerevisiae* IF0 0216

注5: 透析膜透過液(分画分子量1,000以下の画分)

注6: 限外濾過膜透過液(分画分子量1,000以下の画分)

注7: 透析内液(分画分子量1,000以上の画分)

【0024】

【実施例3】

(1) 酵素分解処理液(液体栄養培地)の調製  
蒸留水に酸性プロテアーゼ「盛進製薬社製、モルシン」0.5重量%、セルラーゼ「協和酸酵社製、ドリセラージェ」0.5重量%を添加溶解後、0.45μmのフィルターで除菌し、酵素溶液を調製した。一方、通常の醤油

醸造法に従って脱脂大豆を細長い流路内を高速で流れる圧力6kg/cm<sup>2</sup>、温度165℃の過熱水蒸気を以て加熱し、変性処理脱脂大豆を得た(特公昭46-34747号参照)。上記酵素溶液500mlに上記で得た加熱変性脱脂大豆粉末100gを添加し、37℃、24時間保持して、酵素分解液を調製した。次いで、この分解液をナイロン濾布を用いて濾過し、澄明な液356ml

を得た。次いで、これを分画分子量1000の限外濾過膜「アドバンテック東洋社製、L0010」にて処理し、透過液を得た。

## (2) 酵母の培養

上記高蛋白質含有原料の酵素分解処理液(分画分子量1000以下の画分)を3.0ml取りこれをそのまま酵母接種用の培地として使用し、グルコースを5%、食塩含量を17%に調整した後、5ml容ネジキャップ付きバイアルビンにとり、これに表1に記載の酵母をスラントから1白金耳接種し、時々攪拌しながら、30℃で1週間静置培養したところ、表1に記載の如きHEMFを微量含有する培養液(実施例3)を得た。

【0025】表1における比較例2の結果から、高蛋白質含有原料の酵素分解液を分子ふるい処理することなくそのままの栄養培地に添加含有せしめた培地に、酵母を接種培養すると、該培地中にHEMFを生成蓄積せしめることができるが、この場合得られる培養液には図2の結果に示すように、非常に数多くの不純物質が含まれているために、この中から目的とするHEMFを精製操作が複雑になる欠点を有する。また、表1における比較

例1の結果から、高蛋白質含有原料の酵素分解液を分子ふるい処理し該分解液中の分子量1000を越える物質を添加含有した培地に、酵母を接種培養しても、該培地中にHEMFを蓄積生成蓄積させることができない。これに対して表1における実施例1~3の区分の結果から、高蛋白質含有原料の酵素分解液を分子ふるい処理し該分解液中の分子量1000以下の物質を分離しこれを含有した培地に、酵母を接種培養すると培地中にHEMFを蓄積生成蓄積せしめることができ、しかも図1の結果が示すように、不純物質が殆ど含まれていないために、この中から目的とするHEMFの精製操作が非常に簡単であることが判る。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2で得られた培養液中のHEMFを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分析した結果を示す。

【図2】比較例2で得られた培養液中のHEMFを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分析した結果を示す。

【図1】



